

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/88, 15/12, 5/10, A61K 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40182 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Oktober 1997 (30.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00772 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. April 1997 (14.04.97) (30) Prioritätsdaten: 196 17 837.1 19. April 1996 (19.04.96) DE 196 17 846.0 19. April 1996 (19.04.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: PECHER, Gabriele [DE/DE]; Strasse 36, Nr. 26, D-13125 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

(54) Title: GENETICALLY TRANSFECTED HUMAN DENDRITIC CELLS, THEIR PRODUCTION AND USE, PREFERABLY AS VACCINES

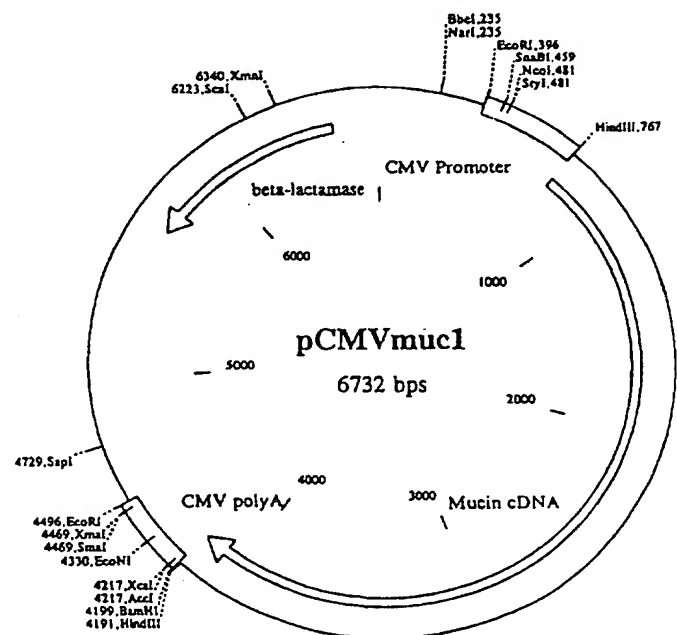
(54) Bezeichnung: GENTRANSFIZIERTE HUMANE DENDRITISCHE ZELLEN, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG, BEVORZUGT ALS VAKZINE

(57) Abstract

Genetically transfected human dendritic cells are disclosed, as well as their production and use, preferably as vaccines. The invention has applications in the pharmaceutical industry and in medicine. The dendritic cells are produced by transfection with a foreign gene by means of liposomes, preferably by means of lipofectin, a liposome preparation. The disclosed vaccine consists of human, autologous dendritic cells transfected with a partial sequence of the human mucine-MUC1 gene which contains several tandem repeat nucleotide sequences of MUC1. By using a glycosylation inhibitor, tumour-associated epitopes are created in these cells, preferably at their surface.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft gentransfizierte humane dendritische Zellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung, bevorzugt als Vakzine. Anwendungsgebiete sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin. Die Herstellung der dendritischen Zellen erfolgt durch Transfektion eines fremden Gens mittels Liposomen, vorzugsweise mit der Liposomenpräparation Lipofektin. Die erfindungsgemäße Vakzine besteht aus humanen, autologen dendritischen Zellen, die mit einer Teilsequenz des humanen Mucin-MUC1-Gens, die mehrere "Tandem Repeat Nukleotid Sequenzen" von MUC1 enthält, transfiziert sind, und bei denen durch die Anwendung eines Glykosylierungs-inhibitors tumorassoziierte Epitope, bevorzugt auf der Zelloberfläche, ausgebildet sind.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Gentransfizierte humane dendritische Zellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung, bevorzugt als Vakzine

Beschreibung

Die Erfindung betrifft gentransfizierte humane dendritische Zellen. Gentransfizierte dendritische Zellen können sowohl in der Grundlagenforschung als auch zur Konstruktion von Vakzinen, z. B. Tumorstoffimpfungen, Anwendung finden. Ein effizienter Gentransfer in humane dendritische Zellen ist bisher nicht beschrieben worden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung dieser Zellen und ihre Verwendung, bevorzugt als Vakzine.

Zelluläre Vakzine gegen Tumorerkrankungen sind seit längerem bekannt. Die klassische und vielfach klinisch eingesetzte Vakzine besteht aus einem Gemisch von bestrahlten Tumorzellen und Adjuvantien wie beispielsweise Lysate von *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) oder *Corynebacterium Parvum*. Nach zwei Jahrzehnten klinischer Erprobung läßt sich zusammenfassen, daß diese Vakzine keine reproduzierbare Wirkung zeigt (s. Übersichtsartikel. Oettgen, H. und Old, L., *The History of Cancer Immunotherapy*, in: *Biological Therapy of Cancer*, Eds. V. deVita, S. Hellmann and S. Rosenberg, J. B. Lippincott Company 1991, S. 87-199).

In jüngerer Zeit wurden Versuche unternommen, Tumorzellen genetisch zu modifizieren, mit dem Ziel eine Immunantwort gegen den Tumor auszulösen. Verwendet werden dazu vor allem Gene für Zytokine oder kostimulierende Moleküle allein oder in Kombination (Blankenstein T., *Eur. J. Cancer*, 1994). Der Nachteil dieser Vakzine besteht darin, daß zu ihrer Herstellung Tumorzellen verwendet werden müssen. Diese stellen wiederum ein Potential möglicher Metastasenbildung dar, und somit kann die Vakzine selbst bei ihrer Anwendung ein Risiko

für den Patienten darstellen. Tumorzellen besitzen keine kostimulierenden Liganden wie CD80 und CD86, die für eine effektive Aktivierung des Immunsystems essentiell sind. Außerdem ist nicht klar definiert, gegen welche immunogenen Strukturen auf den Tumorzellen eine Immunantwort ausgelöst wird. Erfolgt z. B. eine Reaktion gegen Autoantigene (immunogene Strukturen, die nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf gesunden Zellen vorhanden sind), wäre es möglich, daß Antoimmunreaktionen durch diese Art von Vakzine ausgelöst werden.

Deshalb wurde in letzter Zeit darauf fokussiert, tumorspezifische Strukturen zu bestimmen. Eine solche Struktur findet sich auf dem Muzinmolekül von Tumorzellen. (Finn, O.J. 1993, Tumor rejection antigens recognized by T lymphocytes. Current Opinion in Immunol., 5, 701-8).

Das Glykoprotein Muzin, kodiert durch das Gen MUC1, ist sowohl auf der Oberfläche von Pankreas-, Mamma-, Kolon-, Parotis- und Ovarialkarzinomen als auch auf den entsprechenden gesunden Zellen exprimiert. Muzin, kodiert durch MUC1, besteht zu zwei Dritteln aus 20 bis 100 "Tandem Nukleotid repeats". Ein "Tandem Nukleotid repeat" besteht aus 60 Nukleotiden, die ein Polypeptid von 20 Aminosäuren kodieren (s. Abb. 2).

Infolge einer unvollständigen Muzin-Glykosylierung im Fall der malignen Entartung liegen auf Tumorzellen Peptid-Epitope frei, die vom Immunsystem, insbesondere T Zellen, als fremd erkannt werden können (diese Peptid-Epitope sind auf gesunden Zellen von Kohlenhydraten "verdeckt" und lösen deshalb bei normalen Zellen keine Immunreaktion aus). Diese Muzin-Epitope sind für eine Stimulierung des Immunsystems zur körpereigenen Abwehr gegen einen Tumor geeignet.

Es hat bereits Versuche gegeben, Muzin-Epitope mittels Gentransfer in solchen humanen Immunzellen zur Expression zu bringen. Probleme dabei sind der Vektor, die

Transfektionsmethode sowie die richtige Wahl von geeigneten Immunzellen. Der verwendete Vektor pDKOF/MUC1, (beschrieben in Jerome K. R., N. Domenech, and O. J. Finn. 1993. Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells tranfected with polymorphyc epithelial mucin complementary DNA. J. of Immunol. 151: 1654-1662 und in Jerome K. R., D. Bu, and O. J. Finn. 1992. Expression of tumor-associated epitopes on Epstein-Barr Virus-immortalized B-cells and Burkitt s lymphomas tranfected with epitheal mucin complementary DNA. Canc. Res. 53: 5985-5990) führt, transfiziert in humane Zellen, nicht zu einer effizienten und stabilen Muzin-Epitop-Expression und ist somit für die Verwendung in einer Vakzine nicht oder nicht so gut geeignet.

Als Transfektionsmethode wurde dabei die Elektroporation angewendet, eine nicht immer erfolgreiche Methode, bei der sehr viele Zellen absterben.

Als Immunzellen wurden bisher EBV-immortalisierte B-Zellen benutzt und mit MUC1-Vektoren transfiziert und zur Stimulation des Immunsystems benutzt (beschrieben in Jerome K. R., N. Domenech, and O. J. Finn. 1993. Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells tranfected with polymorphyc epitheal mucin complementary DNA. J. of Immunol. 151: 1654-1662 und in Pecher G. and Finn O. J. 1996. Induction of cellular immunity in chimpanzees to tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC1 cDNA-tranfected EBV-immortalized autologous B-cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993: 1699-1704 sowie Patentanmeldung G. Pecher: Vakzine gegen Tumorerkrankungen, DE-OS 195 166 73 vom 28.4.1995). EBV-immortalisierte B-Zellen produzieren jedoch auch immunsupprimierende Faktoren wie Interleukin 10 und zu ihrer Herstellung werden humanpathogene Viren (EBV=Epstein-Barr-Virus) verwendet.

Die Erfindung hat das Ziel, gentransfizierte humane dendritische Zellen zur Verfügung zu stellen. Auf der Basis

dieser Zellen soll ferner gentechnisch eine Vakzine entwickelt werden, die das Immunsystem gegen bereits im Körper vorhandene Tumorzellen spezifisch stimuliert und zur Verkleinerung bzw. Beseitigung des Tumors führen soll. Anstelle von Tumorzellen sollen "professionelle" Immunzellen zur Expression von tumorassoziierten Epitopen zur Konstruktion einer Vakzine verwendet werden. Bestimmte "professionelle" Immunzellen exprimieren, im Gegensatz zu Tumorzellen, die für eine optimale T-Zellaktivierung notwendigen kostimulierenden Liganden, wie z. B. CD80 und CD86.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1, 2 und 9 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Das wesentliche Merkmal des Herstellungsverfahrens ist die Transfektion des fremden Gens in die dendritischen Zellen mittels Liposomen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist effizient, einfach durchzuführen, sicher in der Anwendung, und, im Vergleich zu beispielsweise einem retroviralen Gentransfer, kostengünstig.

Im folgenden wird die bevorzugte Verwendung der humanen dendritischen Zellen als Vakzine näher beschrieben.

Die Vakzine besteht aus humanen autologen dendritischen Zellen, die mit einer Teilsequenz des humanen Mucin-MUC1-Gens, die mehrere "Tandem Repeat Nukleotid Sequenzen" vom MUC1 (Abb. 2) enthält, mittels Lipofektin unter Verwendung des Plasmids transfiziert sind, und die durch Behandlung mit dem Glykosylierungsinhibitor Phenyl-N-Acetyl- α -D-Galactosaminid tumorassoziierte Epitope exprimieren.

Die MUC1 transfizierten Zellen werden mit dem Glykosylierungsinhibitor Phenyl-N-Acetyl- α -D-Galactosaminid für 24 bis 36 Stunden behandelt, damit die immunogenen, tumorassoziierten Mucin-Epitope ausgebildet werden. Die

Expression kann durch eine FACS-Analyse mittels Muzin-Epitop-spezifischen Antikörpern überprüft werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch der Vektor pCMV/MUC1 gemäß Abb. 1 zur Transfektion der dendritischen Zellen, der aus folgenden wesentlichen Bestandteilen besteht:

- immediate early Promotor des Cytomegalievirus (CMV) für Muzin-MUC1-Genabschnitte
- Teilsequenz des Muzin-MUC1-Gens.

Die erfindungsgemäße Vakzine hat folgende Vorteile/Neuerungen gegenüber bisherigen Tumorzellen:

Die Vakzine enthält keine Tumorzellen, sondern ein klar definiertes Antigen (MUC1).

Zur Konstruktion der Vakzine verwendete Immunzellen sind dendritische Zellen. Autologe dendritische Zellen als Immunzellen stellen, anderes als Tumorzellen oder EBV-immortalisierte Zellen, für den Patienten kein Risiko dar. Sie exprimieren in idealer Weise die für die T-Zellaktivierung notwendigen kostimulierenden Liganden wie CD89 und CD86. Sie produzieren immunstimulierende Stoffe, wie Interleukin 12. Als weiteren Vorteil produzieren dendritische Zellen im Gegensatz zu beispielsweise EBV-immortalisierten B-Zellen, keine immunsupprimierenden Stoffe wie Interleukin 10.

Die Herstellung humaner dendritischer Zellen erfolgt aus peripherem Blut von Patienten oder Gesunden unter Verwendung von Interleukin 4 und Granulozyten-Makrophagen-Coloniestimulierendem Faktor. Das ist ein einfaches und leicht zu praktizierendes Verfahren.

Transfektionsmethode ist die Lipofektion. Dabei wird eine hohe Gentransferrate in dendritischen Zellen erreicht. Die Methode ist einfach durchzuführen und reproduzierbar.

Als Vektor für den Gentransfer wird pCMV/MUC1 gemäß Abb.1 verwendet. In den Vektor wurde die entsprechende Muzin-cDNA unter dem immediate early Promotor von CMV kloniert. Der Vektor enthält keine cDNA für eine Resistenz gegenüber Antibiotika o.ä. Der Vektor erfüllt somit hohe

Sicherheitsanforderungen für die Anwendung am Menschen.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Vakzine besteht darin, daß die Erkennung der Muzin-Peptid-Epitope durch zytotoxische T Zellen nicht dem bisher bekannten klassischen Weg der Erkennung von kurzen Peptid-Epitopen in Verbindung mit dem HLA-Komplex folgt. Die Muzin-Peptid-Epitope werden ohne "Hilfe" des HLA-Komplexes von den T-Zellen erkannt. Diese Besonderheit bei der Erkennung der tumorassoziierten Muzin-Epitope erklärt sich aus der oben genannten besonderen "Tandem repeat"-Struktur des Moleküls sowie der hohen Dichte des Antigens auf der präsentierenden Zelle. Die mehrfache Wiederholung des immunogenen Peptid-Epitop-Motivs führt zu einer Aktivierung der T Zellen durch ein "Crosslinking" des T-Zell-Rezeptors, ohne daß der HLA-Komplex vorhanden sein muß. Das ermöglicht den Einsatz der Vakzine, die die entsprechenden Muzin-Epitope enthält, bei jedem Patienten, unabhängig von HLA-Typ. Das bedeutet einen Vorteil gegenüber Vakzinen, die Epitope anderer Antigene außer Muzin enthalten, und die nur Patienten mit dem jeweiligen passenden HLA-Typ verabreicht werden können.

Durch die Kombination dieser Neuerungen wird erfindungsgemäß die Konstruktion einer optimalen Vakzine erreicht.

Wirkprinzip der erfindungsgemäßen Vakzine:

Infolge der unvollständigen Glykosylierung des Glykoproteins Muzin im Fall der malignen Entartung liegen auf Tumorzellen Peptid-Epitope frei, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden können. Die dadurch ausgelöste Aktivierung des Immunsystems reicht bei Tumorpatienten nicht aus, um den Tumor zu beseitigen, weil (durch die fehlende Expression von CD80 und CD86 auf Tumorzellen) keine Kostimulation von T-Zellen erfolgt. Mit der erfindungsgemäßen Vakzine wird eine effiziente, tumorspezifische Immunantwort, die auf der Aktivierung Muzinepitop-spezifischer, zytotoxischer T-Zellen beruht, ausgelöst. Diese T-Zellen führen zur Verkleinerung

bzw. Beseitigung der Tumorzellen. Werden dendritische Zellen mit MUC1 (Kopien der Tandem Nukleotid-Sequenz von MUC1 kloniert in den Vektor) transfiziert und gegebenenfalls mit dem Glykolysierungs-inhibitor Phenyl-N-Acetyl- α -D-Galactosaminid behandelt, exprimieren diese die tumorassoziierten Epitope. Die auf diesem Wege erreichte Kombination von Bereitstellung von kostimulierenden Liganden und einer genügenden Anzahl von tumorassoziierten Epitopen führt zu einer Aktivierung von Muzinepitop-spezifischen T-Zellen, die für eine Tumorabstoßung erforderlich sind.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

1. Ausführungsbeispiel (Herstellung der transfizierten Zellen)

Dendritische Zellen werden aus humanem peripherem Blut isoliert und kultiviert. Am Tag 4 der Kultur der dendritischen Zellen wird die Transfektion der dendritischen Zellen vorgenommen. Dazu wird ein Vektor verwendet, der CMV als Promotor für das Fremdgen MUC1 enthält. Für 750 000 dendritische Zellen werden 15 μ l Lipofektin (Abb. 3) verwendet. Die erfolgreiche Transfektion des Fremdgens MUC1 wird mittels FACS-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper HMFG-2 gegen Muzinepitope nachgewiesen. Nach Transfektion zeigen 12% der dendritischen Zellen eine Expression von Muzinepitopen. Durch Verwendung eines Glykosylierungs-inhibitors (GI) sind bei 48% der dendritischen Zellen Muzinepitope auf der Oberfläche nachweisbar. Das kennzeichnet den erfolgreichen Gentransfer. Auch ohne Einsatz des Glykosylierungs-inhibitors sind schon ausreichend immunogene Muzinepitope auf der Oberfläche vorhanden.

Mock (Vektor ohne Fremdgen)-transfizierte Zellen exprimieren Muzinepitope zu höchstens 2% (s. Abb. 4)

2. Ausführungsbeispiel (Verwendung als Vakzine)

2.1. Herstellung der Vakzine

Aus humanem peripherem Blut werden Lymphozyten per Ficoll-Gradienten-Zentrifugation gewonnen und in Kultur gehalten. Dendritische Zellen werden durch die Zugabe von Interleukin 4 und Granulozyten-Makrophagen-Colonie stimulierendem Faktor und durch die Adhärenz zu Plastik selektioniert. Die dendritischen Zellen werden mittels Liposomen mit dem MUC1-Vektor transfiziert. Die Muzin-Expression wird mittels Western-Blot-Verfahren sowie FACS-Analyse mit monoklonalen Muzin-Antikörpern überprüft. In das Kulturmedium der transfizierten Zellen wird Phenyl-N-Acetyl- α -D-Galactosaminid (Konzentration 5 mM) für 36 Stunden gegeben. Die Expression der dadurch erzeugten tumorassoziierten Muzin-Peptid-Epitope hält für 72 Stunden an und wird mit monoklonalen Muzin-Peptid-Antikörpern mittels FACS-Analyse überprüft. Die Vakzine wird innerhalb dieser 72 Stunden dem Patienten appliziert.

2.2. Verwendung der Vakzine

Die Vakzine ist für die Therapie bei Patienten mit Muzin (MUC1)-exprimierenden Tumoren einsetzbar. Bevorzugt ist die Behandlung von Mamma-, Pankreas-, Ovarial-, Kolon- und Parotistumoren. Die Anwendung dieser Vakzine kann ebenfalls bei Gesunden zur Vorbeugung eines Muzinepitope exprimierenden Tumors erfolgen.

Patentansprüche

1. Gentransfizierte humane dendritische Zellen
2. Verfahren zur Gentransfektion von humanen dendritischen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion eines fremden Gens mittels Liposomen erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Gentransfektion von humanen dendritischen Zellen mit der Liposomenpräparation Lipofektin erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur liposomalen Gentransfektion von humanen dendritischen Zellen ein Vektor, der den Cytomegalievirus (CMV) als Promotor für das fremde Gen enthält, verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration von Lipofektin für die Transfektion von 750 000 dendritischen Zellen zwischen 5 bis 20 μ l beträgt.
6. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration von Lipofektin für die Transfektion von 750 000 dendritischen Zellen 15 μ l beträgt.
7. Verfahren nach Anspruch 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion an den Tagen 3 bis 5 der Kultur der dendritischen Zellen erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion am Tage 4 der Kultur der dendritischen Zellen erfolgt.
9. Verwendung der nach Anspruch 1 bis 8 hergestellten Zellen nach Anspruch 1 als Vakzine gegen Tumorerkrankungen.

10. Verwendung der nach Anspruch 1 bis 8 hergestellten Zellen nach Anspruch 1 als Vakzine gegen Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß als cDNA zur Transfektion der humanen dendritischen Zellen die cDNA eines humanen Tumorantigens verwendet wird.

11. Vakzine gegen humane Tumorerkrankungen unter Verwendung der humanen cDNA des Tumorantigens Muzin, bestehend aus

- humanen, autologen dendritischen Zellen, die mit einer
- Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens, die mehrere "Tandem Repeat Nukleotid Sequenzen" von MUC1 enthält, transfiziert sind,
- und bei denen durch die Anwendung eines Glykosylierungs-inhibitors tumorassoziierte Epitope, bevorzugt auf der Zelloberfläche, ausgebildet sind.

12. Vakzine nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens mittels Liposomenpräparationen in die dendritischen Zellen transfiziert wird.

13. Vakzine nach Anspruch 11 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens mit dem Vektor pCMV/MUC1 mit folgenden wesentlichen Bestandteilen transfiziert wird:

- immediate early Promotor CMV für Muzin-MUC1-Genabschnitte
- Teilsequenz des Muzin-MUC1-Gens.

14. Vakzine nach Anspruch 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens im Vektor 12-40 "Tandem Nukleotid-repeats" enthält, wobei ein repeat die Nukleotid-Sequenz gemäß Abb. 2 aufweist.

15. Vakzine nach Anspruch 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens im Vektor 22 "Tandem Nukleotid-repeats" enthält.

16. Vakzine nach Anspruch 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Glykosylierungsinhibitor Phenyl-N-Acetyl- α -D-Galactosaminid verwendet wird.

17. Vakzine nach Anspruch 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die dendritischen Zellen aus peripherem Blut von Patienten oder gesunden Personen unter Verwendung der Zytokine Interleukin 4 und Granulozyten-Makrophagen-Colonie stimulierendem Faktor gewonnen werden, daß die so gewonnenen dendritischen Zellen die Oberflächenmarker CD1a, CD80, CD86 exprimieren und, daß auf den dendritischen Zellen nach Transfektion mit MUC1 tumorassoziierte immunogene Epitope auf der Oberfläche nachweisbar sind.

18. Vakzine nach Anspruch 11 bis 17 zur Behandlung von Muzin exprimierenden Tumoren, wie Mamma-, Pankreas-, Ovarial-, Kolon- und Parotistumoren, bei Patienten.

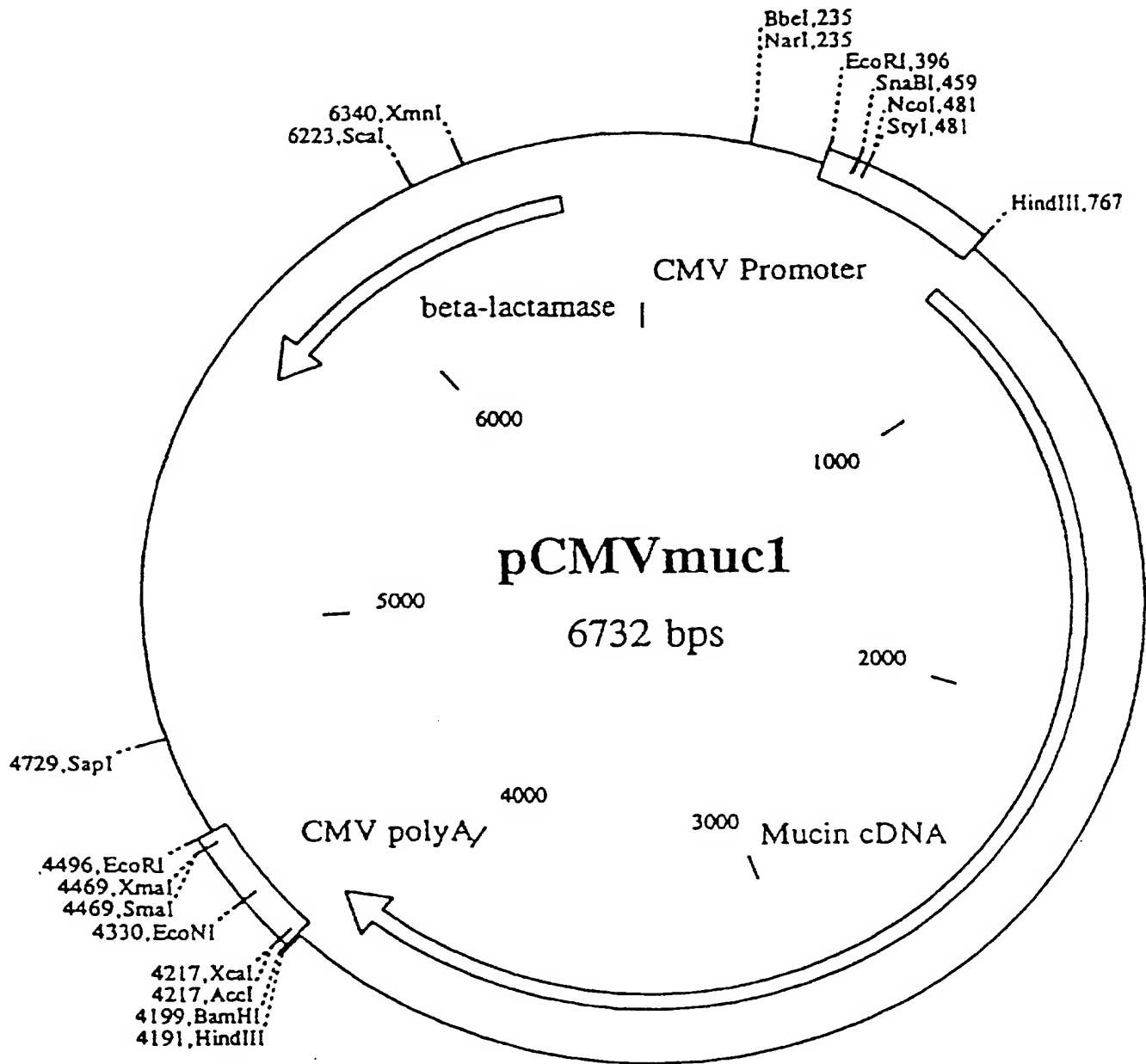


Abb. 1

Ersatzblatt

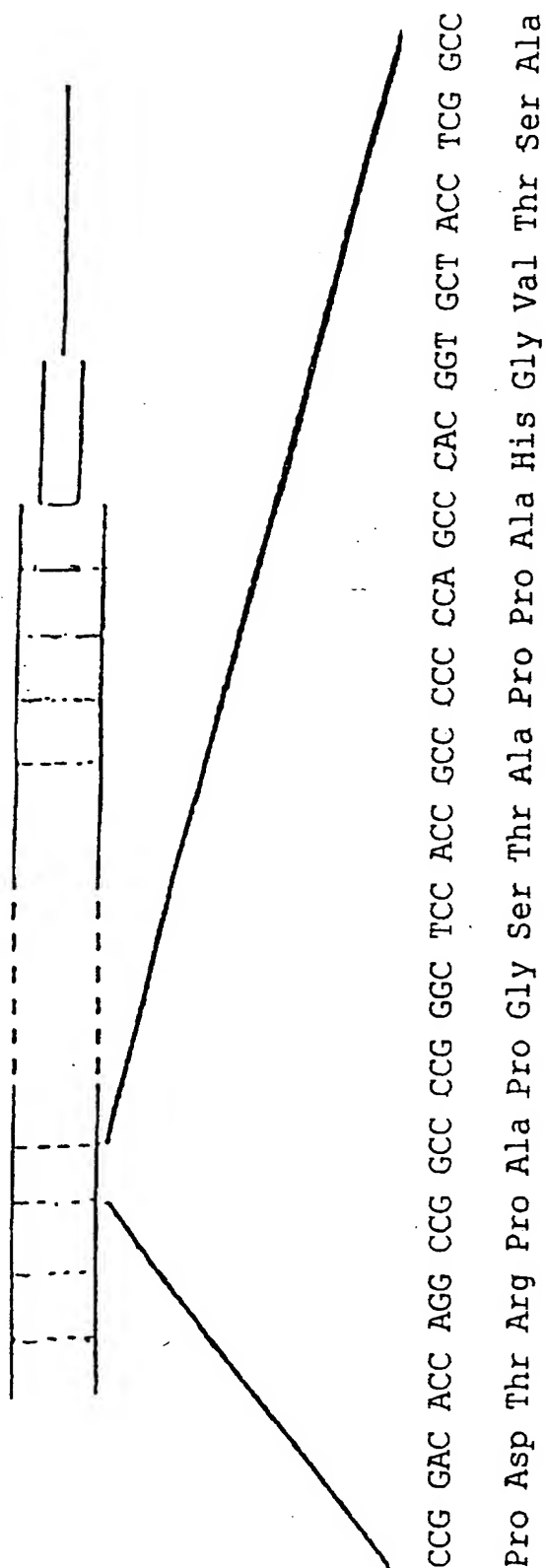


Abb. 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

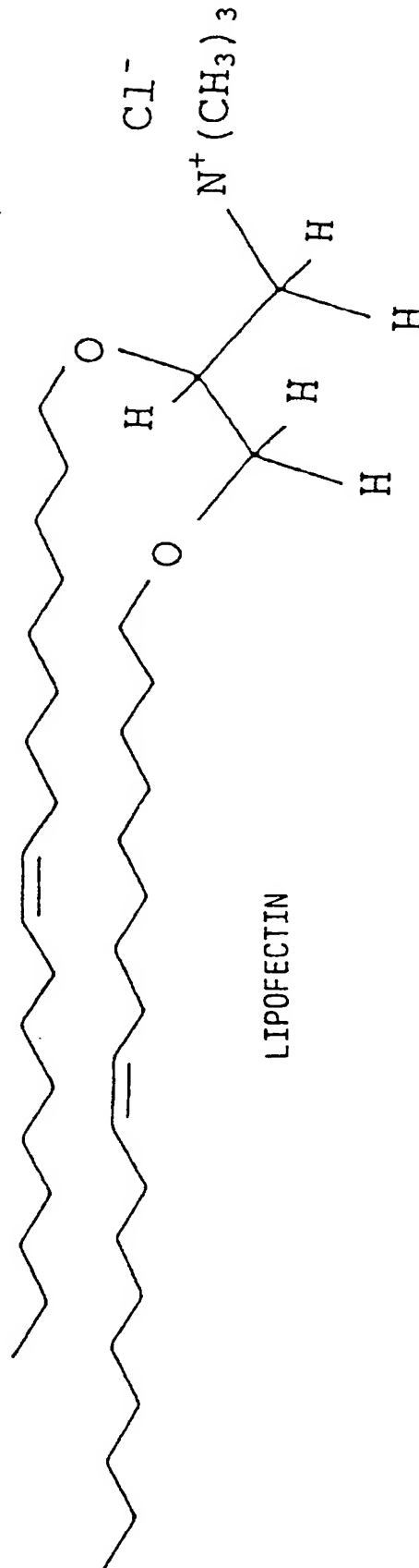


Abb. 3

FACS-Analyse: MUC1-Expression auf dendritischen Zellen (DC)
72 Stunden nach liposomalem Gentransfer (unter Verwendung
des Antikörpers HMFG-2)

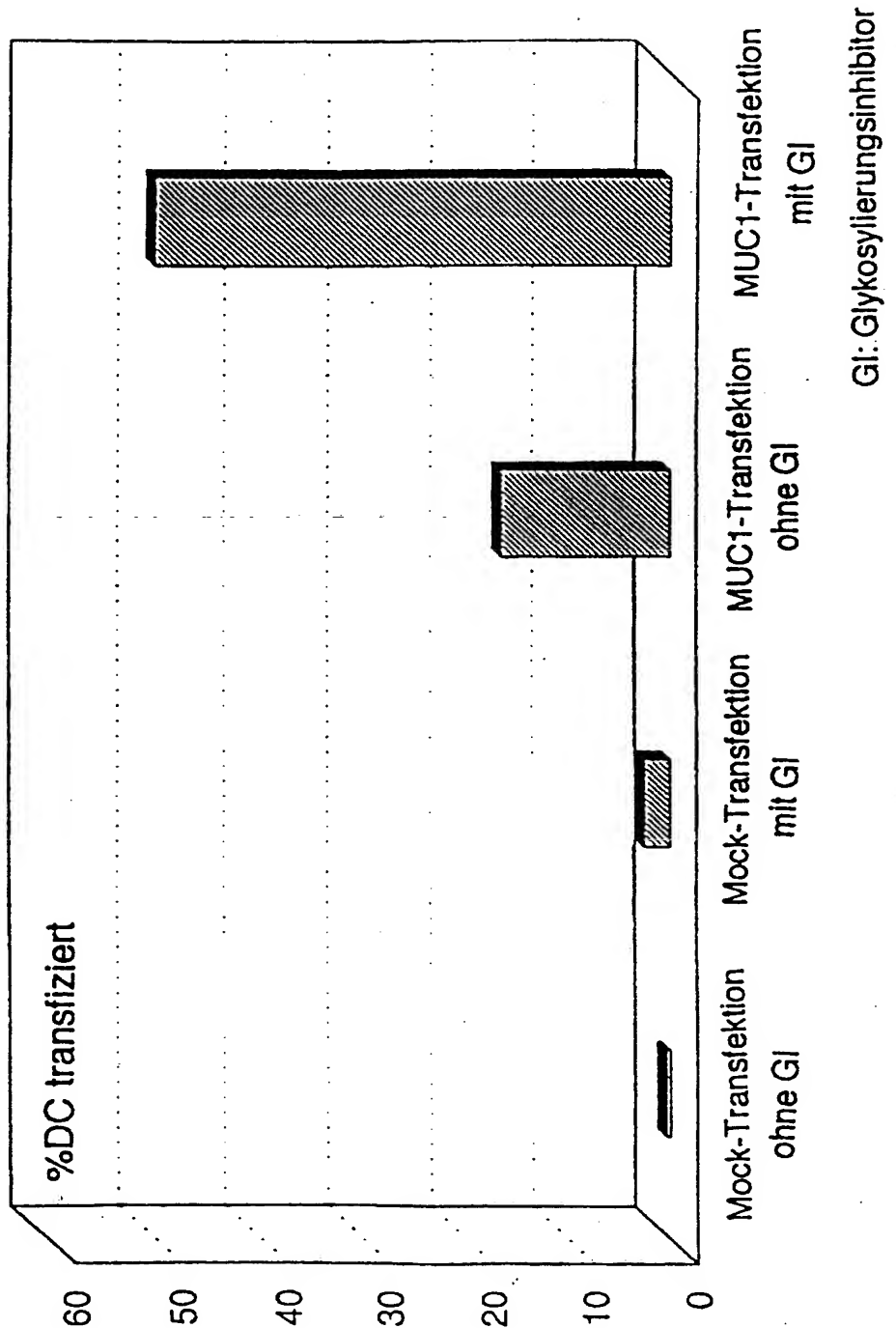


Abb. 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/DE 97/00772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/88 C12N15/12 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANCER GENE THERAPY, vol. 2, no. 4, 1995, page 312 XP002039139 ARTHUR J. ET AL.: "A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells" see the whole document ---	1-3
X	CANCER BIOTHERAPY, vol. 10, no. 1, 1995, page 82 XP002039140 FINN, O.: "Mucin-based cancer vaccines"	1,9,10
Y	* see in particular lines 1-24 * ---	2-8, 11-18
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 August 1997

Date of mailing of the international search report

16. 09. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/DE 97/00772

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ONKOLOGIE, vol. 18, no. Sup.2, 1995, page 176 XP002039141 PECHER G. ET AL.: "MUC1-gene transfer into antigen presenting cells for immunotherapy of pancreatic cancer" see the whole document ---	1,9-11, 13-18
X	PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 37, March 1996, pages 486-487, XP002039142 SPAHN G. ET AL.: "MUC1 gene transfer into human dendritic cells" see the whole document ---	1-18
Y	CANCER RESEARCH, vol. 52, no. 21, 1 November 1992, pages 5985-5990, XP002039143 JEROME K. ET AL.: "Expression of tumor-associated epitopes on Epstein-Barr Virus-immortalized B-cells and Burkitt's Lymphomas transfected with epithelial mucin complementary DNA" cited in the application * see the whole document, in particular P.5986 1./2.column, paragraph "Transfection of ..." *	2-8, 11-18
A	PNAS, U.S.A., vol. 93, no. 4, 20 February 1996, pages 1699-1704, XP002039144 PECHER G. AND FINN O.: "Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA-transfected Epstein-Barr virus-immortalized autologous B cells" cited in the application * See the whole document, in particular P.1699, re. Column, lines 2-7 *	1-18
A	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 3, 1 August 1993, pages 1654-1662, XP002039145 JEROME K. ET AL.: "Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA" cited in the application see the whole document ---	9-18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/DE 97/00772

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 37, March 1996, page 444 XP002039146 BARRATT-BOYES S. ET AL.: "Studies in a chimpanzee model of dendritic cell-based cancer vaccines" see the whole document ---	1-18
A	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. Sup. 21a, 1995, page 18 XP002039147 BARRATT-BOYES S. ET AL.: "Use of dendritic cells to augment the immune response to tumor-associated mucin in two animal models" see the whole document ---	1-18
P,X	WO 97 03703 A (RHONE POULENC RORER PHARMA ;PHILIP RAMILA (US); LEBKOWSKI JANE S () 6 February 1997 * see the whole document, in particular P. 9-12, claim 24 * -----	1,2,4, 7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT /DE 97/00772

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See Annex
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Remark: Although claims 9 and 10 relate to a method for treatment of the human or animal body (EPC Article 52(4)), the search was carried out, based on the alleged effects of the compound or composition.

Information on patent family members

PCT/DE 97/00772

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/88 C12N15/12 C12N5/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CANCER GENE THERAPY, Bd. 2, Nr. 4, 1995, Seite 312 XP002039139 ARTHUR J. ET AL.: "A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells" siehe das ganze Dokument ---	1-3
X	CANCER BIOTHERAPY, Bd. 10, Nr. 1, 1995, Seite 82 XP002039140 FINN, O.: "Mucin-based cancer vaccines"	1,9,10
Y	* siehe bes. Z.1-24 * ---	2-8, 11-18

	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. August 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16.09.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ONKOLOGIE, Bd. 18, Nr. Sup.2, 1995, Seite 176 XP002039141 PECHER G. ET AL.: "MUC1-gene transfer into antigen presenting cells for immunotherapy of pancreatic cancer" siehe das ganze Dokument ---	1,9-11, 13-18
X	PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, Bd. 37, März 1996, Seiten 486-487, XP002039142 SPAHN G. ET AL.: "MUC1 gene transfer into human dendritic cells" siehe das ganze Dokument ---	1-18
Y	CANCER RESEARCH, Bd. 52, Nr. 21, 1.November 1992, Seiten 5985-5990, XP002039143 JEROME K. ET AL.: "Expression of tumor-associated epitopes on Epstein-Barr Virus-immortalized B-cells and Burkitt's Lymphomas transfected with epithelial mucin complementary DNA" in der Anmeldung erwähnt * siehe das ganze Dokument, bes. S. 5986, 1./2. Spalte, Abschnitt "Transfection of ..." * ---	2-8, 11-18
A	PNAS, U.S.A., Bd. 93, Nr. 4, 20.Februar 1996, Seiten 1699-1704, XP002039144 PECHER G. AND FINN O.: "Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA-transfected Epstein-Barr virus-immortalized autologous B cells" in der Anmeldung erwähnt * siehe das ganze Document, bes. S. 1699, re. Spalte, Z. 2-7 * ---	1-18
A	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 151, Nr. 3, 1.August 1993, Seiten 1654-1662, XP002039145 JEROME K. ET AL.: "Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	9-18
-/--		

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, Bd. 37, März 1996, Seite 444 XP002039146 BARRATT-BOYES S. ET AL.: "Studies in a chimpanzee model of dendritic cell-based cancer vaccines" siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-18
A	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, Bd. Sup. 21a, 1995, Seite 18 XP002039147 BARRATT-BOYES S. ET AL.: "Use of dendritic cells to augment the immune response to tumor-associated mucin in two animal models" siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-18
P,X	<p>WO 97 03703 A (RHONE-POULENC RORER PHARMA ; PHILIP RAMILA (US); LEBKOWSKI JANE S () 6. Februar 1997 * siehe das ganze Dokument, bes. S. 9-12, claim 24 *</p> <p>-----</p>	1,2,4, 7-10

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Siehe Annex
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl die Ansprüche 9, 10 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen (Artikel 52(4) EPU), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/DE 97/00772

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/88, 15/12, 5/10, A61K 48/00</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40182</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Oktober 1997 (30.10.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00772</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 14. April 1997 (14.04.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 17 837.1 19. April 1996 (19.04.96) DE 196 17 846.0 19. April 1996 (19.04.96) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: PECHER, Gabriele [DE/DE]; Strasse 36, Nr. 26, D-13125 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Mit geänderten Ansprüchen.</i></p> <p>Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche: 18. Dezember 1997 (18.12.97)</p>	

(54) Title: GENETICALLY TRANSFECTED HUMAN DENDRITIC CELLS, THEIR PRODUCTION AND USE, PREFERABLY AS VACCINES

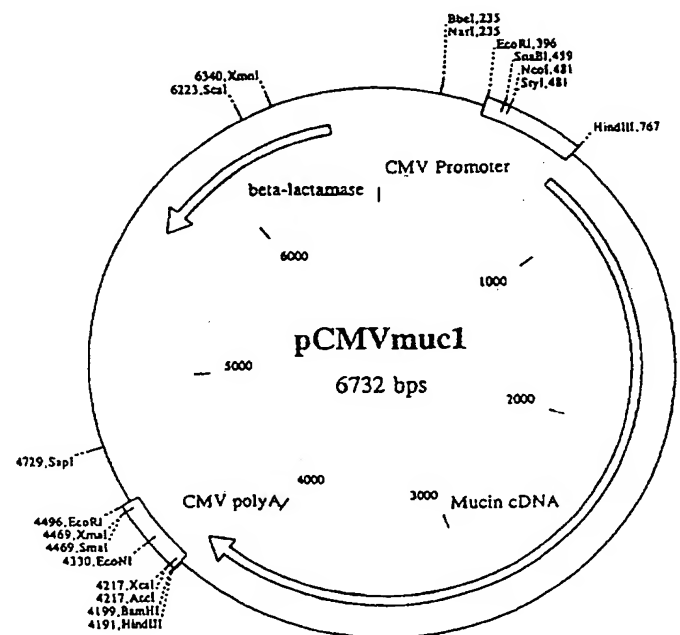
(54) Bezeichnung: GENTRANSFIZIERTE HUMANE DENDRITISCHE ZELLEN, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG, BEVORZUGT ALS VAKZINE

(57) Abstract

Genetically transfected human dendritic cells are disclosed, as well as their production and use, preferably as vaccines. The invention has applications in the pharmaceutical industry and in medicine. The dendritic cells are produced by transfection with a foreign gene by means of liposomes, preferably by means of lipofectin, a liposome preparation. The disclosed vaccine consists of human, autologous dendritic cells transfected with a partial sequence of the human mucine-MUC1 gene which contains several tandem repeat nucleotide sequences of MUC1. By using a glycosylation inhibitor, tumour-associated epitopes are created in these cells, preferably at their surface.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft gentransfizierte humane dendritische Zellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung, bevorzugt als Vakzine. Anwendungsgebiete sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin. Die Herstellung der dendritischen Zellen erfolgt durch Transfektion eines fremden Gens mittels Liposomen, vorzugsweise mit der Liposomenpräparation Lipofektin. Die erfindungsgemäße Vakzine besteht aus humanen, autologen dendritischen Zellen, die mit einer Teilsequenz des humanen Mucin-MUC1-Gens, die mehrere "Tandem Repeat Nukleotid Sequenzen" von MUC1 enthält, transfiziert sind, und bei denen durch die Anwendung eines Glykosylierungsinhibitors tumorassoziierte Epitope, bevorzugt auf der Zelloberfläche, ausgebildet sind.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 11. November 1997 (11.11.97);
ursprüngliche Ansprüche 1-18 durch neue Ansprüche 1-13 ersetzt (3 Seiten)]

1. Verfahren zur Gentransfektion von humanen dendritischen Zellen,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Transfektion eines fremden Gens mit der Liposomenpräparation Lipofektin erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
ein Vektor, der den Cytomegalievirus (CMV) als Promotor für das fremde Gen enthält, verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Konzentration von Lipofektin für die Transfektion von 750000 dendritischen Zellen zwischen 5 bis 20 μ l beträgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration 15 μ l beträgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion an den Tagen 3 bis 5 der Kultur der dendritischen Zellen erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion am Tage 4 erfolgt.
7. Verwendung von gentransfizierten humanen dendritischen Zellen
als Vakzine gegen Tumorerkrankungen.
8. Verwendung nach Anspruch 7 zur Behandlung von Muzin exprimierenden Tumoren, wie Mamma-, Pankreas-, Ovarial-, Kolon- und Parotistumoren, bei Patienten.
9. Verfahren zur Herstellung einer Vakzine gegen humane Tumorerkrankungen unter Verwendung der humanen cDNA des Tumorantigens Muzin, bestehend aus

GEÄNDERTES BLATT (ARTIKEL 19)

- humanen, autologen dendritischen Zellen, die mit einer
 - Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens, die mehrere "Tandem Repeat Nukleotid Sequenzen" von MUC1 enthält, transfiziert sind,
 - und bei denen durch die Anwendung eines Glykosylierungs-inhibitors tumorassoziierte Epitope, bevorzugt auf der Zelloberfläche ausgebildet sind,
- indem die Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens mittels Liposomenpräparationen in die dendritischen Zellen mit dem Vektor pCMV/MUC1 mit den wesentlichen Bestandteilen
- immediate early Promotor CMV für Muzin-MUC1-Genabschnitte
 - Teilsequenz des Muzin-MUC1-Gens
- transfiziert wird,
- wobei die Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens im Vektor 12-40 "Tandem Nukleotid-repeats" enthält und ein repeat die Nukleotid-Sequenz gemäß Abb.2 aufweist.

10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens 22 "Tandem Nukleotid-repeats" enthält.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
dendritische Zellen aus peripherem Blut von Patienten oder gesunden Personen unter Verwendung der Zytokine Interleukin 4 und Granulozyten-Makrophagen-Colonie stimulierendem Faktor gewonnen werden, daß die so gewonnenen dendritischen Zellen die Oberflächenmarker CD1a exprimieren und, daß auf den dendritischen Zellen nach Transfektion mit MUC1 tumorassoziierte immunogene Epitope auf der Oberfläche nachweisbar sind.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß eine Behandlung der MUC1 transfizierten Zellen mit dem Glykosylierungsinhibitor Phenyl-N-Acetyl- α -D-Galactosaminid für 24 bis 36 Stunden erfolgt.

GEÄNDERTES BLATT (ARTIKEL 19)

13. Vakzine gegen humane Tumorerkrankungen unter Verwendung der humanen cDNA des Tumorantigens Muzin, bestehend aus
- humanen, autologen dendritischen Zellen, die mit einer
 - Teilsequenz des humanen Muzin-MUC1-Gens, die mehrere "Tandem Repeat Nukleotid Sequenzen" von MUC1 enthält, transfiziert sind,
 - und bei denen durch die Anwendung eines Glykosylierungs-inhibitors tumorassoziierte Epitope, bevorzugt auf der Zelloberfläche ausgebildet sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)